

雌ラットの性機能に及ぼすデヒドロエピアンドロステロン 投与の影響に関する研究

金沢大学医学部産科婦人科学講座 (主任：西田悦郎教授)

打出 喜 義

雌ラットの性機能に及ぼすデヒドロエピアンドロステロン (dehydroepiandrosterone, DHA) の影響を明らかにするために、ラットの新生児期に相当する生後5日齢から春機発動前期に当たる30日齢に至るまでの5, 10, 15, 20, 25, 30日齢に、それぞれラット体重100gあたり1, 2および10mgのデヒドロエピアンドロステロン・アセテート (DHA-acetate, DHA-Ac) を1回皮下投与し、性機能の発現、成熟に及ぼす影響を腔開口日齢およびその後の腔スメアの面から検討した。DHA-Acの投与時期・投与量によってその後の性機能に及ぼす影響に違いが見られた。体重100gあたり10mgの多量投与群では、すべての投与時期において腔開口日齢の早発化と不規則な性周期発現頻度の増加が認められた。すなわち、腔開口日齢は各対照群に比べ、59.4~81.2%と早発化し、とくに10日齢、20日齢に投与された場合に最も著明で、それぞれ比較対照群の60.7, 59.4%であった。また、腔開口から初回発情までの期間は、各対照群の0.2~1.1日に比し、DHA-Acが20日齢までに投与された場合6.3~14.4日と明らかな延長がみられた。なお、25日齢以降に投与された場合には1.7~2.1日と腔開口後比較的短期で発情期スメアが観察された。また、腔開口後に不規則な性周期を示す率はその投与日齢に関わらず比較対照群に比べ1.5~2.6倍であった。体重100gあたり2mgのDHA-Ac中量投与群では、20日齢以降に投与された場合においてのみ腔開口日齢の早発化が認められ、その率は各対照群に比し79.5~82.4%であった。腔開口後初回発情までの期間は2.4~5.8日と各対照群の0.3~1.1日に比し軽度の延長が見られ、腔開口後に不規則な性周期を示す率は比較対照群の1.6~2.2倍であった。体重100gあたり1mgの少量DHA-Ac投与群においては、30日齢投与において腔開口日齢の早発化を認めたが、その後の性機能に著明な影響は認められなかった。以上の結果は、雌ラットにおける一過性の高DHA血症が新生児期、乳児期で高度に惹起された場合には性機能の発現成熟に対し抑制的に働き、一方春機発動前期における適度の高DHA血症は性機能の発現成熟に対し促進的に作用することを示唆している。

Key words female rat, dehydroepiandrosterone, vaginal opening, sexual cycle

副腎性アンドロゲン (adrenal androgens) として知られているデヒドロエピアンドロステロン (dehydroepiandrosterone, DHA) やその硫酸抱合型であるデヒドロエピアンドロステロン・サルフェート (dehydroepiandrosterone sulfate, DHA-S) の分泌には、加齢に伴う特徴的变化が認められ^{1)~5)}、種族保存や個体保存に密接に関与しているものとみなされている。しかし、その詳細についてはなお不明の点が多い。

種族保存には、女性ではまず卵巣機能が正常に発現し円滑に作動することが必要であるが、内分泌環境の変調や肥満・ヤセといった代謝異常症などの原因により、排卵障害といった種々の程度の卵巣機能障害状態が惹起される。とくに、副腎皮質は発生学的に卵巣と近縁関係にあり、クッシング (Cushing) 症候群やアジソン (Addison) 氏病等の副腎皮質機能異常症の場合に無月経などの月経異常を併発することは良く知られている^{6)~7)}。また、臨床の場においていわゆる特発性の排卵障害状態も散見されるが、その病因として副腎性アンドロゲンの関与している

ことが示唆されている。さらに、副腎性アンドロゲンは思春期の発来 (春機発動, pubarche) に密接に関与しているとの報告も見られる^{8)~9)}。

卵胞の発育開始より排卵に至るまでの過程には、卵胞刺激ホルモン (follicle-stimulating hormone, FSH), 黄体形成ホルモン (luteinizing hormone, LH), インヒビン (inhibin), アクチビン (activin) など種々のペプチドホルモンのみならず卵巣内のアンドロゲンも重要な役割を演じている^{10)~13)}。発育卵胞外層の莢膜細胞により産生されたアンドロゲンは内層の顆粒膜細胞に渡され、エストロゲンの基質となり卵胞の発育に促進的に作用し^{14)~15)}、また一方では卵胞の閉鎖過程にも密接に関与しており¹⁶⁾、女性の性機能維持の上で重要な役割を果たしている。

本研究では、ヒト副腎性アンドロゲンであるDHAの卵巣機能に及ぼす影響をみるため、雌ラットを対象として、卵巣機能発現前の種々の時期にDHAを投与し、その後の腔開口時期 (春機発動時期) と腔スメアによる性周期の観察を行ない、

平成5年3月23日受付, 平成5年4月16日受理

Abbreviations: DHA, dehydroepiandrosterone; DHA-Ac, dehydroepiandrosterone acetate; DHA-S, dehydroepiandrosterone sulfate; FSH, follicle-stimulating hormone; LH, luteinizing hormone; PCOS, polycystic ovary syndrome

DHA と性機能の発現成熟との関連性について考究した。

材料および方法

I. 実験動物

実験には、当教室で継代飼育されたウイスター (Wistar) 系ラット (日本チャールズ・リバー、厚木) を用いた。飼育条件としては、室温を $23 \pm 2^\circ\text{C}$ に保ち、人工照明は午前5時より午後7時までの14時間とし、飼料 (オリエンタル NMF ラット繁殖用、オリエンタル酵母工業株式会社、東京) と飲料水は自由摂取とした。継代飼育方法としては、80~120日齢の発情前期の腔スメアを呈する雌ラットを、成熟雄ラットのケージに一晩同居・自然交配させ、翌朝腔内に精子の有無を確認した後それぞれのケージ [35×30×16 (cm)] に戻し、経日的に腹部増大・分娩徴候の観察を行ない、仔が出生した日をもって1日齢とした。5日齢のとき一腹あたり仔数および雌雄数を調査し、少なくとも雌が一腹あたり4匹以上認められたもののみを本実験に用いた。また、雄で仔数がそれぞれ8匹となるように調整を行ない、各親ラット間における仔ラットの発育に極端な差が現われないよう留意した。なお、本実験群の対照群における仔の体重増加は図1に示すごとくであった。

II. 実験方法

1. DHA 製剤とその投与方法

DHA製剤 (デヒドロエピアンドロステロン・アセテート, dehydroepiandrosterone acetate, DHA-Ac) および油溶媒 (ゴマ油) は、帝国臓器製薬 (東京) 作製のもので、体重 100g あたり 0.1ml となるようその濃度を調整し使用した。投与方法としては、微量注射器 (マイクロシンジ, microsyringe) に27ゲージ針を付け、ラット背部に皮下投与した。投与に際しては、針を刺入部位より約 1cm 皮下に通した後上記製剤を注入し、その後しばらく刺入部位を圧迫し漏れないことを確認した。

2. DHA-Ac の投与時期と投与量

実験群は、DHA-Ac の投与日齢から 1) 5日齢投与、2) 10日齢投与、3) 15日齢投与、4) 20日齢投与、5) 25日齢投

与、6) 30日齢投与の6群に分け、さらにその投与量から、それぞれ 1) 対照群 (油溶媒, 0.1ml/100g 体重)、2) 少量投与群 (1mg/100g 体重)、3) 中量投与群 (2mg/100g 体重)、4) 多量投与群 (10mg/100g 体重) の4群として、225匹の雌ラットを計24群に分け比較検討した。なお、DHA-Ac の投与は、各投与日齢に1回皮下注射によって行った。

3. 性機能の観察事項

本研究においては、ラット性機能に及ぼす影響として、腔開口の時期とその後の腔スメアの変化を中心に検討した。実験開始後より連日午後5~7時に腔開口の有無を、また腔開口後は60~70日齢まで経日的に腔スメアの変化を観察した。

腔開口の判定は視診により行ない、また、腔スメアの観察は少量の0.9%日局生理食塩水を含むスポイトを腔口より約5mm 挿入し、腔腔を2~3回洗浄して得られた腔内からの洗浄液をスライドガラスに展開して行なった。性周期の判定は、成書に記載されている以下の方法により行なった¹⁾。すなわち、連日の腔スメア観察において、核の明瞭な有核円形細胞優位の場合は発情前期 (proestrus, P)、核が消失した角化細胞優位の場合を発情期 (estrus, E)、多数の白血球の中に少数の角化細胞と死滅しかけた有核細胞が混在する場合を発情後期 (metestrus, ME)、全体的に細胞がまばらで白血球、角化細胞が散在する場合を発情間期 (diestrus, D) と判定し、発情間期を挟み発情期のスメア像が4日目に認められた場合を4日周期、5日目に認められた場合を5日周期、6日以上の間隔または連続して発情期が認められた場合を不規則周期と判定した。観察されたすべての周期に占める4日、5日、不規則周期のそれぞれの割合を各実験群において求め比較検討した。

なお、DHA-Ac の腔開口に及ぼす効果は、各実験群における対照群 (100%) に対する DHA-Ac 投与群腔開口日齢の比率、および、DHA-Ac 投与から腔開口までの期間 (D) と DHA-Ac 投与群と比較対照群の腔開口日齢の差 (C) の比 (C/D 比) について比較検討した。

4. 統計学的検討

実験結果の統計学的検討は、独立2群の平均値の差の検定の場合は等分散検定のあと二標本t検定 (two sample t test) またはウェルチ法 (two sample t test with Welch's correction) により行ない、関連多群の平均値の差の検定は二元配置分散分析法 (two-way analysis of variance; two-way ANOVA) とフィッシャーのLSD法 (least significant difference) により、またかけ離れた値の棄却検定はスミルノフの棄却検定 (Smirnov test for extreme value) を用い行なった。

成 績

I. DHA-Ac の投与の腔開口日齢に及ぼす影響

本実験の対照群全例における平均腔開口日齢は、 39.1 ± 4.3 日 (平均値±標準偏差, $n=55$) であった。各対照群の腔開口日齢をそれぞれ100%とした場合、各 DHA-Ac 投与群における腔開口日齢の比率は、図2に示す通りであった。すなわち、少量投与群においては30日齢に投与された場合のみ、腔開口日は比較対照群の93.8%と有意に早発化したが ($P<0.05$)、25日齢以前に投与された場合には著明な変化は見られなかった。中量投与群では30日齢、25日齢、20日齢投与において、それぞれ比較対照群の79.5%、82.4%、81.2%であり、有意の早発化が認められた ($P<0.01$)。一方、多量投与群においてはその投与時期

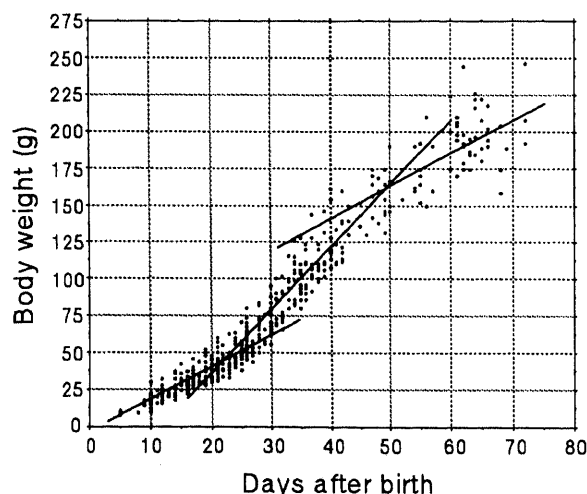


Fig.1. Scattergram showing correlation between body weight and days after birth in the control rats. The regression lines are calculated from day 5 to 20 ($Y=1.99X-1.54$), 21 to 50 ($Y=4.46X-57.1$), and thereafter ($Y=2.17X+56.5$).

に関わらず比較対照群の59.4%~81.2%と有意に早発化した ($P<0.01$).

C/D 比は、図3の通りであり、DHA-Ac 投与群においてその投与日齢と量により有意に変化することが認められた ($P<0.05$). すなわち、DHA-Ac 多量投与の各実験群においては、5日齢投与では+0.53, 10日齢と15日齢投与ではそれぞれ+1.25, +1.23となり、20日齢投与では+2.78, 25日齢投与では+3.02, 30日齢投与では+3.34と5日齢投与の値のほぼ6倍の値を示した. また、中量投与群では、5, 10, 15日齢投与でそれぞれ+0.06, -0.02, +0.07, 20日齢, 25日齢投与では+0.52, +0.68, 30日齢投与においては+1.84であった. 少量投与群では、5日齢~25日齢投与群の値は-0.06~+0.09であ

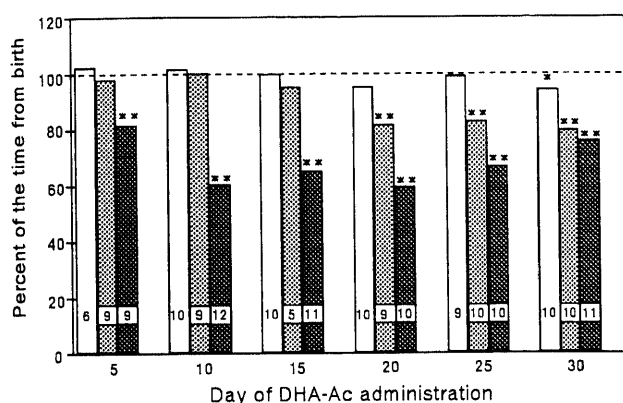


Fig. 2. Effect of DHA-Ac on the day of vaginal opening. Each column represents the percent of the time from birth at vaginal opening in DHA-Ac treated groups (□, 1mg/100g BW; ▨, 2mg/100g BW; ▩, 10mg/100g BW) compared to the time at vaginal opening in the respective control groups. Figures in columns indicate the number of rats examined.

** $P<0.01$, * $P<0.05$ vs the respective control group.

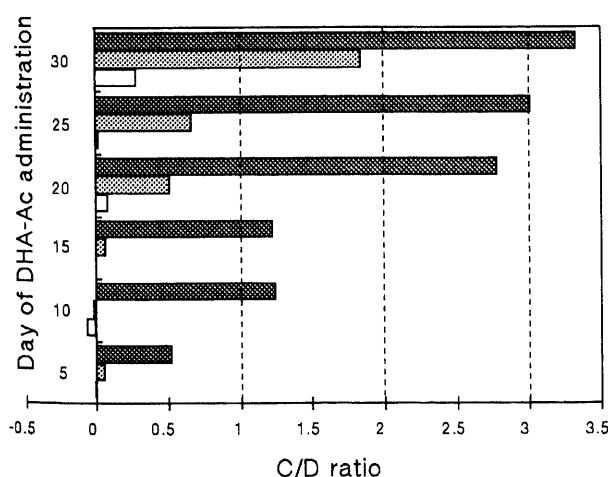


Fig. 3. Effect of DHA-Ac on the day of vaginal opening expressed as the ratio of the duration from the day of vaginal opening in the DHA-Ac treated group to the day of vaginal opening in the control group (C), to the duration from the day of DHA-Ac injection to the day of vaginal opening in the DHA-Ac treated group (D). (□, 1mg/100g BW; ▨, 2mg/100g BW; ▩, 10mg/100g BW).

*; $P<0.05$ vs the other groups by 2-way ANOVA followed by LSD method.

り、30日齢投与においてのみ+0.29と他の投与日齢群のそれに比しやや大きな値を示した.

II. DHA-Ac の体重増加に及ぼす影響と腔開口時の体重について

各実験群の腔開口時体重は、表1に示す通りであり、対照群全体の腔開口時体重は 119.0 ± 15.8 g であった. DHA-Ac 多量投与の各投与日齢群における腔開口時体重は、5日齢 59.9 ± 27.9 g, 10日齢 45.2 ± 10.5 g, 15日齢 50.9 ± 12.4 g, 20日齢 50.4 ± 6.3 g, 25日齢 74.0 ± 8.1 g, 30日齢 80.2 ± 9.5 g と、すべての投与日齢群においてそれぞれの対照群に比し有意に低値であり ($P<0.01$), また、投与日齢が早くなるほど低値となる傾向が現れた. 20, 25, 30日齢中量投与群の腔開口時体重も、 92.1 ± 24.6 g, 98.7 ± 26.1 g, 82.7 ± 17.2 g と、それぞれの対照群に比し有意に低値であった ($P<0.01$). 一方、少量投与群の腔開口時体重には有意の差は見られなかった. なお、DHA-Ac 投与群における腔開口時の日齢 (X) と体重 (Y) との関係は図4に示すごとくであり、DHA-Ac 投与群の腔開口時体重は、全対照群の相当日齢体重に比しやや少ない傾向にあった.

III. DHA-Ac の腔スメア所見に及ぼす影響

各実験群における腔開口平均日齢から初回発情平均日齢までの期間は表2に示すごとくであった. 対照群全例におけるその期間は 0.6 ± 0.4 日 (0.2~1.1日) で、ほぼ腔開口に一致して発情期の発現が認められた. 少量投与群では 1.3 ± 0.5 日 (0.5~2.0日) で、対照群と同様ほぼ腔開口に一致して発情期の発現が認められた. 中量投与群では、15, 20, 25日齢投与の場合、その期間はそれぞれ3.7, 5.2, 5.8日、多量投与群では、5, 10, 15, 20日齢投与においてそれぞれ6.3, 15.2, 13.2, 14.4日であり、DHA-Ac 多量投与群では対照群や他の投与群に比べ、腔開口平均日齢から初回発情平均日齢までの期間に延長が認められた ($P<0.01$).

初回発情平均日齢から次回発情平均日齢までの期間は、それぞれ表3に示すごとくであり、対照群、投与群すべての平均値、標準偏差を求めスミルノフの棄却検定を行なうと、25日齢の多量投与群においてのみ13.4日と、有意に大きな値を示した ($P<0.05$).

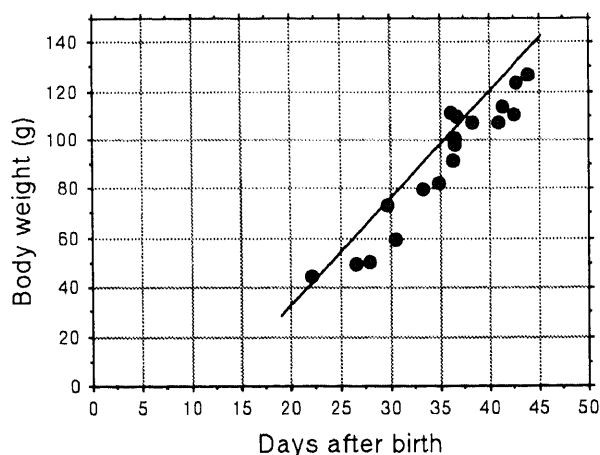


Fig. 4. Scattergram showing correlation between the body weight and the days after birth of the vaginal opening in the DHA-Ac treated groups. The regression line ($Y=4.46X-57.1$) is calculated for days 21 to 50 in the control group.

腔開口後の性周期 (観察された全周期に対する4日, 5日, 不正周期の比率) は, 表4~6に示すごとくであった。4日周期のものは対照群全体では62.3±6.3 (54.5~69.0) %に観察されたが, DHA-Ac 投与群においては, 少量投与群41.9~68.4%, 中量投与群38.4~63.6%, 多量投与群33.3~45.7%であり, DHA-Ac の多量投与群においては4日周期を示すものが有意に低下し, 逆に不規則周期を示すものの上昇がみられた ($P<0.01$)。一方, 5日周期を示すものの比率は, 表5に示すごとく, 対照群全体では22.9±4.1 (17.9~28.9) %であったが, 少量投与群では13.7~30.8%, 中量投与群では16.0~30.8%, 多量投与群では22.0~42.2%であり, 投与量による明らかな影響はみられなかった。

考 察

女性の一生は, 加齢に伴う卵巢機能の推移から大別することが可能であり, 卵巢機能が開始する時期を思春期, その終焉する時期は更年期と呼ばれている。ところで, 思春期の発来に関連してヒトをはじめとするサル目 (以下, 霊長類と記す) では, 思春期副腎皮質機能亢進徴候発現 (adrenarche) として知られている副腎性アンドロゲンの特徴的な分泌亢進が認められ¹⁹⁾, 性機能の発現に副腎機能がなんらかの影響を及ぼしていると考えられている。一方, ネズミ目 (以下, げっ歯類と記す) のラット雌においては, ヒトなどに見られる特徴的な副腎性アンドロゲンの変動は認めないとされ, 当教室の村上は, 60日齢発情期のラット血中 DHA 濃度は20歳代ヒト女性の血中 DHA 濃度の約1/15で, 日齢の変動では20日齢でやや上昇するが50日齢までは低値であり, その主要産生臓器は副腎ではなく卵巢であると報告している¹⁹⁾。したがって, 血中 DHA 濃度には種差があり, ラットなどのげっ歯類においてはヒトに見られるような思春期副腎皮質機能亢進徴候発現は認められない。しかし, このような春機発動以前に固有の DHA 濃度変化を持たないラットは, 実験的に種々の時期に一過性の高 DHA 血症を惹起させ, その生物学的作用を研究するためには, 逆に好都合なモデルであるとも考えられる¹⁹⁾。

なお, 本実験のような雌ラットを用いてのアンドロゲン負荷にあたっては, クレメンズ効果 (Clemens effects) に配慮する必要がある。すなわち, 子宮内で雌に挟まれていた雌ラットには, 挟まれていない雌よりも生後に投与された男性ホルモンの作用が強く発現するが, これは子宮内での両側の雄からの男性ホルモンが生後の雌ラットの男性ホルモン感受性に影響するためとされている (子宮内胎児位置効果; intrauterine position effect)²⁰⁾。今回, 生後5日目の調査時点における平均雌雄数は,

雌5.9±2.2匹, 雄5.3±2.4匹と, 雌の方がやや多い傾向にあったが, 投与ホルモンの効果が比較的一定になるように, 極端に雄の多い場合にはそれらの雌は実験には用いないように注意した。なお, 母ラット一腹あたりの雌ラット比率は, 40%未満のものが17腹 (13.9%), 40~60% のものが65腹 (53.3%), 60% 以上のものが40腹 (32.8%) であった。

生後の体重増加と性機能の発現とは密接に関連している。雌ラットの成長段階は, 出生より7日齢までを新生児期, 8日齢から21日齢までを乳児期, 32日齢までを幼児期, 幼児期以降腔開口期までを春機発動前期と4段階に分けられており, それ以降が性成熟期とされている²¹⁾。この分類に従えば, 本研究における各対照群雌ラットの体重増加のスパートは乳児期の終わり (離乳期) から性成熟の開始周辺期にわたり著明に認められた。すなわち, 5日齢より20日齢までは1日あたり約2g, その後50日齢頃までは4.5g, それ以降は2.2gの体重増加を示しており, 体重増加は幼児期から大きくなり春機発動期まで続くものといえる。雌ラット春機発動の代表的徴候とされる腔開口は, 視床下部-脳下垂体-卵巢系の成熟・排卵に伴って認められる現象であり, 幼児期から春機発動前期までの体重増加が少ない場合には腔開口は遅くなり^{22,23)}, 腔開口日齢は暦日齢よりも体重に影響されるといわれている²⁴⁾。ヒト女性の思春期発来時期についても同様の報告が見られ, 特に体脂肪の比率が重視されている^{25,26)}。体重は春機発動に影響する重要な一因子であるが, これにはインスリン, アミノ酸, 必須脂肪酸などが重要な役割を担っている。インスリンは脳内におけるエストロゲン結合を促進し黄体形成ホルモン放出ホルモン (luteinizing hormone-releasing hormone, LHRH) を介したゴナドトロピン放出を亢進させ, またアミノ酸は脳内のセロトニン, アセチルコリン, カテコラミンなどの合成に影響することにより腔開口を速め, 他方必須脂肪酸が胎児期に欠乏すると腔開口および初発排卵が遅延するとされている^{27,28)}。发育段階におけるこのような代謝機能は卵巢機能の発現に重要な役割を演じているが, 卵巢機能が一旦発現した後も痩せや肥満などの代謝異常は続発性無月経を発症させる。若年女性における神経性食思不振症患者と単純性体重減少性無月経症患者の臨床所見と内分泌環境について検索した教室の山城²⁹⁾によれば, これら患者においては間脳-脳下垂体-性腺系機能のみならず副腎皮質系機能にも異常が認められるとしており, 性機能と体重および副腎皮質系機能との関連には興味深いものがある。DHA-Ac 投与群における腔開口時の体重は, 多量投与群のすべてと20日齢以降の中量投与群において, 各比較対照群に比べ低値であったが, 全対照群の相当日齢体重との比較では明らかな差はみられなかった。したがっ

Table 1. Effect of dehydroepiandrosterone acetate (DHA-Ac) administration on body weight at vaginal opening in rats

Amount of DHA-Ac administered (mg/100g body weight)	Body weight (mean±S.D.) at vaginal opening									
	Time (days after birth) of DHA-Ac administration									
	5	10	15	20	25	30				
0 (control)	103.3±9.3 (6)	108.6±14.0 (10)	121.5±18.8 (10)	118.9±9.1 (10)	129.7±12.9 (10)	126.2±13.9 (9)				
1	107.7±21.9 (6)	101.1±19.3 (10)	123.7±13.9 (10)	110.7±15.5 (10)	127.1±20.5 (9)	114.3±19.6 (10)				
2	100.9±19.1 (9)	111.3±13.9 (9)	107.6±15.7 (5)	92.1±24.6** (9)	98.7±26.1** (10)	82.7±17.2** (10)				
10	59.9±27.9** (9)	45.2±10.5** (12)	50.9±12.4** (11)	50.4±6.3** (10)	74.0±8.1** (10)	80.2±9.5** (11)				

** ; $P<0.01$ vs respective controls by Student's t test. Each figure in parenthesis indicates the number of rats.

て、DHA-Ac 投与時にみられる腔開口の早発はラットの体重増加に基づく二次的なものではなく、DHA そのものの作用に起因するものと考えられた。

DHA-Ac 投与による腔開口の著明な早発化は、多量投与群においてはその投与時期に係わらずすべてに認められたが、C/D 比の面でも投与時期によって差がみられた。C/D 比の大きい場合は、DHA-Ac 投与により腔開口が対照群に比し著しく早発化したことを示し、小さい場合は腔開口早発化の程度は小さいこと、すなわち対照群における腔開口日齢近傍で投与群に腔開口が起こったことを意味するが、新生児期（5日齢）、乳児期（10、15日齢）、乳児期から幼児期への移行期（20日齢）と投与時期が遅くなるほど C/D 比は次第に大きくなり、幼児期（25、30日齢）投与では新生児期投与の6倍の値を示した。このことから、DHA-Ac の投与時期が本来の腔開口時期に近いほど、腔開口早発化に及ぼす影響は強く発現するものと推察された。この傾向は、少量、中量投与群においても同様に認められた。すなわち、中量投与群では20日齢以降の投与において、また少量投与

群では30日齢投与において、DHA-Ac の腔開口に対する早発化作用が著明であった。

腔開口日から発情期スメア像を呈するまでの日数には、DHA-Ac 投与群全体では1.7～15.2日と各投与群において大きな差異が認められた。ラット乳児期の早期に投与を受け腔開口が早発した多量投与群では、腔開口時のスメア像は発情間期の像を示し、発情期の像が認められるまでの平均日数は高度に延長する傾向が認められたが、生後25、30日齢の幼児期に投与を受け腔開口の早発した群では、1.7～2.1日と対照群とほぼ同様の期間で初回発情が認められた。このことから、腔開口と性周期発現との関係は DHA-Ac 投与の時期、量によりかなり影響されるものと推察された。一般に、雌ラットでは腔開口は初発排卵に続いて起こり、排卵に伴って上昇したエストロゲンの影響で、腔開口時の腔スメアは発情前期または発情期の像を呈するとされている³⁰⁾³¹⁾。本実験の全対照群では、腔開口日から発情期のスメア像を呈するまでの期間（初回発情日数）は0.2～1.1日と、腔開口にほぼ一致して発情前期または発情期の腔スメア

Table 2. Effect of dehydroepiandrosterone acetate (DHA-Ac) on the duration from the mean day of vaginal opening to the mean day of first estrus

Amount of DHA-Ac administered (mg/100g body weight)	Duration from the mean day of vaginal opening to the mean day of first estrus					
	Time (days after birth) of DHA-Ac administration					
	5	10	15	20	25	30
0 (control)	1.1 (6)	0.2 (10)	0.6 (10)	1.1 (10)	0.5 (10)	0.3 (9)
1	1.2 (6)	2.0 (10)	0.5 (10)	1.5 (10)	1.2 (9)	1.3 (10)
2	0.6 (9)	1.8 (9)	3.7 (5)	5.2 (9)	5.8 (10)	2.4 (10)
10**	6.3 (9)	15.2 (12)	13.2 (11)	14.4 (10)	2.1 (10)	1.7 (11)

** ; P<0.01 vs the other groups by 2-way ANOVA followed by LSD method. Each figure in parenthesis indicates the number of rats.

Table 3. Effect of dehydroepiandrosterone acetate (DHA-Ac) on the duration from the mean day of first estrus to the mean day of second estrus

Amount of DHA-Ac administered (mg/100g body weight)	Duration from the mean day of first estrus to the mean day of second estrus					
	Time (days after birth) of DHA-Ac administration					
	5	10	15	20	25	30
0 (control)	8.8 (6)	6.8 (10)	7.6 (10)	6.2 (10)	6.2 (10)	5.1 (9)
1	6.7 (6)	5.1 (10)	7.7 (10)	4.3 (10)	5.8 (9)	6.9 (10)
2	8.7 (9)	5.0 (9)	7.7 (5)	9.4 (9)	6.1 (10)	9.2 (10)
10	7.5 (9)	4.9 (12)	7.5 (11)	8.7 (10)	13.4 * (10)	12.2 (11)

* ; P<0.05 vs the others by Smirnov test. Each figure in parenthesis indicates the number of rats.

Table 4. Effects of dehydroepiandrosterone acetate (DHA-Ac) on the ratio of 4-day cycles to total cycles observed

Amount of DHA-Ac administered (mg/100g body weight)	Ratio of 4-day cycles to total cycles observed					
	Time (days after birth) of DHA-Ac administration					
	5	10	15	20	25	30
0 (control)	66.1	69.0	61.2	54.5	55.5	67.6
1	68.4	53.6	41.9	58.8	54.8	50.0
2	58.3	63.6	38.4	40.0	48.0	54.0
10**	38.8	39.4	38.1	34.8	33.3	45.7

** ; P<0.01 vs the other groups by 2-way ANOVA followed by LSD method.

像を呈していたが、このことから腔開口時には高率に排卵を伴っていたものと考えられる。しかし、乳児期の早期に DHA-Ac を投与し、腔開口の早発化が認められた群においては、初回発情までの日数に高度の延長が認められ、腔開口がみとめられてもその後約2週間は規則的な卵巣周期は認められなかった。われわれが、10日齢に DHA-Ac を多量投与した後、経日的に血中ホルモン変動と卵巣を組織学的な面から検索したところ、腔開口が認められた22日齢前後では、ゴナドトロピンやエストロゲン値には著明な変化はみられず、また、卵巣には小さな発育卵胞が存在するのみで、成熟卵胞や黄体の形成は全く認められなかった³²⁾。この点からも、乳児期に DHA-Ac の投与を受け腔開口が早発した群では、卵巣機能の成熟とは無関係に腔開口のみが早発したことが窺われた。一方、生後25, 30日齢の幼児期に投与された群においては、腔開口後ほぼ対象群と同程度の間隔をもって初回発情が認められ、腔開口時には対照群においてみられたと同様に排卵を伴っているものと推察された^{33,34)}。

雌ラットにおける視床下部-脳下垂体-卵巣系機能の成熟状態は腔開口後の腔スメア観察により推察することが可能であり^{35,36)}、正常雌ラットでは4~5日毎に規則的な腔スメア像の変化が認められる。このような規則的腔スメア像を呈するラットにおいては、視床下部-脳下垂体-卵巣系機能は正常に発現しているものとみなされる。規則的な4日周期の全体に占める割合は、多量の DHA-Ac 投与群においては対照群に比べ低下していることが認められた。このことは、DHA-Ac 投与により腔開口は早発化するが、その後の卵巣機能の正常な発現が阻害されることを示唆しているものと考えられた。

本研究では性機能の発現を腔開口と腔スメアの面から検討したが、腔開口をもって本来の春機発動と同様に取り扱って良いものかどうかは問題となる。とくに乳児期早期の DHA-Ac 多

量投与群においては、腔開口後対照群において認められたような腔スメアの規則的な変化は見られず、初回発情の遅延するものの多いことからみて、視床下部-脳下垂体-卵巣系の機能は規則的には発現していないものと推察された。このことは、この期における血中ホルモンの変動に関する教室の一連の研究からも裏付けられている³²⁾。したがって、規則的な視床下部-脳下垂体-卵巣系機能の発現の面からみると、乳児期に投与された DHA-Ac により早発化した腔開口日を春機発動日齢とするには問題が生ずることになるが、新生児期・乳児期・幼児期のいずれの時期にどのような量の DHA-Ac が投与されたかによって、その影響に差異が認められた。正常の春機発動時期近くに投与された群においては、少量の DHA-Ac によっても腔開口と初回発情発現日齢の早発化が認められ、このことは、ヒト思春期発来に副腎性アンドロゲンの分泌亢進が関与している可能性を示唆しているものと考えられた。また一方、早期に多量投与された場合には、初回発情の遅延と規則的な性周期を示さないものが多くみられた。このことから、副腎性アンドロゲンの過剰が多嚢性卵巣症候群 (polycystic ovary syndrome, PCOS) などの無排卵症の発症に密接に関連していることが示唆された。PCOS は、卵巣の多嚢性変化を特徴としており、内分泌学的には高アンドロゲン血症とゴナドトロピンの異常分泌がみられる^{37)~39)}。PCOS における排卵障害の程度はさまざまで、排卵誘発に容易に反応する軽症のものから硬化型 (sclerotic type) といわれ排卵誘発にも全く反応しない重症のものまで多岐に及んでおり、その病因に関しても未だ定まった見解は得られていない^{40)~43)}。しかし、近年はこの病態を説明するものとして、高アンドロゲン血症が注目されており、異常なゴナドトロピンの分泌亢進や卵巣の多嚢性変化は高アンドロゲン血症の二次的な変化と解されている^{44,45)}。

PCOS におけるアンドロゲンの分泌源としては、副腎と卵巣

Table 5. Effects of dehydroepiandrosterone acetate (DHA-Ac) on the ratio of 5-day cycles to total cycles observed

Amount of DHA-Ac administered (mg/100g body weight)	Ratio of 5-day cycles to total cycles observed					
	Time (days after birth) of DHA-Ac administration					
	5	10	15	20	25	30
0 (control)	17.9	24.0	22.4	25.0	28.9	18.9
1	17.5	17.9	27.9	13.7	23.8	30.8
2	26.4	30.3	30.8	26.7	30.0	16.0
10	35.8	42.2	26.2	26.1	25.5	22.0

Variation between rows or columns is not significant by 2-way ANOVA.

Table 6. Effects of dehydroepiandrosterone acetate (DHA-Ac) on the ratio of irregular cycles to total cycles observed

Amount of DHA-Ac administered (mg/100g body weight)	Ratio of irregular cycles to total cycles observed					
	Time (days after birth) of DHA-Ac administration					
	5	10	15	20	25	30
0 (control)	16.1	6.9	16.4	20.5	15.6	13.5
1	14.0	28.6	30.2	27.5	21.4	19.2
2	15.3	6.0	30.8	33.3	22.0	30.0
10**	25.4	18.2	35.7	39.1	41.2	32.3

** ; P<0.01 vs the other groups by 2-way ANOVA followed by LSD method.

とが考えられているが、主たるものは副腎由来であるとされている⁽⁴⁶⁻⁵⁰⁾。したがって、生後早期における比較的多量の一過性高 DHA 血症によってラット性機能が抑制された本実験の結果からみて、PCOS の発症の一因として、思春期発来以前における副腎性アンドロゲン分泌異常の関与している可能性が示唆された。

以上の結果から、DHA の性機能に及ぼす作用は、生後のそれぞれの時期におけるラット内部環境、すなわち視床下部-脳下垂体-卵巣系の成熟度によって大きく左右されるものと推察された。

結 論

雌ラットにおける性機能の発現成熟に及ぼす DHA の影響を明らかにするために、雌ラットの新生児期に相当する生後 5 日齢から春機発動前期に当たる 30 日齢に至るまでの 5, 10, 15, 20, 25, 30 日齢にそれぞれ 1, 2, 10mg/100g 体重の DHA-Ac を投与し、その後の性機能状態を腔開口日齢と腔スミアの変化の面から検討し、以上の結論を得た。

1. 体重 100g あたり 10mg の多量投与された場合には、腔開口日齢は各対照群のそれに比べ、59.4%~81.2%と早発化したが、その程度は 10 日齢、20 日齢に投与された場合には最も著明で、比較対照群の 60.7, 59.4%であった。腔開口後の腔スミア所見は、20 日齢までに DHA-Ac が投与された場合、初回発情日齢は 6.3~14.4 日と各対照群の 0.2~1.1 日に比し延長がみられた。一方、25 日齢以降の場合には 1.7~2.1 日と腔開口後比較的短期で発情期スミアが観察された。また、腔開口後に不規則な性周期を示す率は、その投与日齢に関わらず比較対照群に比べ 1.5~2.6 倍であった。

2. 体重 100g あたり 2mg の DHA-Ac を投与した場合、20 日齢以降に投与された場合においてのみ、腔開口日齢に影響がみられた。すなわち、腔開口日齢は各対照群に対し、79.5~82.4%早発化した。初回発情日齢は 2.4~5.8 日と各対照群の 0.3~1.1 日に比し軽度の延長がみられた。腔開口後に不規則な性周期を示す率は比較対照群に比し 1.6~2.2 倍であった。

3. 体重 100g あたり 1mg の DHA-Ac 少量投与においては、30 日齢投与のときのみ腔開口の早発化がみられたが、その後の性機能には著明な影響は認められなかった。

以上の結果より、雌ラット性機能の発現成熟に及ぼす DHA-Ac の作用には、その投与時期・投与量によって違いが認められ、雌ラットにおける一過性の高 DHA 血症が新生児期、乳児期で高度に惹起された場合には、性機能の発現成熟に対し抑制的に働き、一方春機発動前期における適度の高 DHA 血症は性機能の発現成熟に対し促進的に作用することが示唆される。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました西田悦郎教授に謹んで謝意を表します。また、本研究の遂行に当たり貴重な御助言を賜りました生理学第一講座永坂鉄夫教授に深謝いたしますとともに、終始ご指導戴きました赤祖父一知助教授ならびに研究の遂行にご協力下さいました寺田 督講師をはじめ教職員各位、穴田幸子、相川みち代、棚田留美子の各事務官に深く感謝致します。

なお、本論文の要旨は、第 8 回日本思春期学会（沖縄、1989）において発表した。

文 献

- 1) 西田悦郎：産科婦人科領域における老年医学的研究とくに閉経後婦人における副腎性 androgen の意義と応用。日産婦誌, 21, 887-894 (1969).
- 2) 荒木克己：女性における血中 dehydroepiandrosterone の動態に関する研究。十全医会誌, 89, 852-876 (1980).
- 3) Sizonenko, P. C. & Paunier, L.: Hormonal changes in puberty III: Correlation of plasma dehydroepiandrosterone, testosterone, FSH, and LH with stages of puberty and bone age in normal boys and girls and in patients with Addison's disease or hypogonadism or with premature or late adrenarche. J. Clin. Endocrinol. Metab., 41, 894-904 (1975).
- 4) Sizonenko, P. C., Paunier, L. & Carmignac, D.: Hormonal changes during puberty. V. Longitudinal study of adrenal androgen secretions. Hormone Res., 7, 288-302 (1976).
- 5) Apter, D., Pakarinen, A., Hammond, G. L. & Vihko, R.: Adrenocortical function in puberty. Acta Paediatr. Scand., 68, 599-604 (1979).
- 6) Styne, D. M., Grumbach, M. M., Kaplan, S. L., Wilson, C. B. & Conte, F. A.: Treatment of Cushing's disease in childhood and adolescence by transsphenoidal microadenectomy. N. Engl. J. Med., 310, 889-893 (1984).
- 7) McNatty, K. P., Short, R. V., Barnes, E. W. & Irvine, W. J.: The cytotoxic effect of serum from patients with Addison's disease and autoimmune ovarian failure on human granulosa cells in culture. Clin. Exp. Immunol., 22, 378-384 (1975).
- 8) Silverman, S. H., Migeon, C., Rosemberg, E. & Wilkins, L.: Precocious growth of sexual hair without other secondary sexual development; "premature pubarche," a constitutional variation of adolescence. Pediatrics, 10, 426-432 (1952).
- 9) Korth-Schutz, S., Levine, L. S. & New, M. I.: Serum androgens in normal prepubertal and pubertal children and in children with precocious adrenarche. J. Clin. Endocrinol. Metab., 42, 117-124 (1976).
- 10) Erickson, G. F. & Hsueh, A. J. W.: Secretion of "inhibin" by rat granulosa cells "in vitro". Endocrinology, 103, 1960-1963 (1978).
- 11) Vale, W., Rivier, J., Vaughan, J., McClintock, R., Corrigan, A., Woo, W., Karr, D. & Spiess, J.: Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. Nature, 321, 776-779 (1986).
- 12) Hasegawa, Y., Miyamoto, K., Abe, Y., Nakamura, T., Sugino, H., Eto, Y., Shibai, H. & Igarashi, M.: Induction of follicle stimulating hormone receptor by erythroid differentiation factor on rat granulosa cell. Biochem. Biophys. Res. Commun., 156, 668-674 (1988).
- 13) Gonzalez-Manchon, C. & Vale, W.: Activin-A, inhibin and transforming growth factor- β modulate growth of two gonadal cell lines. Endocrinology, 125, 1666-1672 (1989).
- 14) Ryan, K. J. & Petro, Z.: Steroid biosynthesis by

human ovarian granulosa and thecal cells. *J. Clin. Endocr.*, **26**, 46-52 (1966).

15) Ryan, K. J., Petro, Z. & Kaiser, J.: Steroid formation by isolated and recombined ovarian granulosa and thecal cells. *J. Clin. Endocr.*, **28**, 355-358 (1968).

16) Erickson, G. F., Magoffin, D. A., Dyer, C. A. & Hofeditz, C.: The ovarian androgen producing cells: A review of structure/function relationships. *Endocr. Rev.*, **6**, 371-397 (1985).

17) 江崎孝三郎: 性周期と腔垢標本. 実験動物学各論 (田嶋嘉雄編), 第5版, 17-18頁, 朝倉書店, 東京, 1975.

18) Cutler, JR. G. B., Glenn, M., Bush, M., Hodgen, G. D., Graham, C. E. & Loriaux, D. L.: Adrenarche: A survey of rodents, domestic animals, and primates. *Endocrinology*, **103**, 2112-2118 (1978).

19) 村上弘一: 雌ラットにおける血中 dehydroepiandrosterone の動態に関する研究. 十全医会誌, **100**, 693-710 (1991).

20) Clemens, L. G.: Neurohormonal control of male sexual behavior. In W. Montagna & W. A. Sadler (eds.), *Advances in Behavioral Biology*, Vol. II, Reproductive Behavior, p23-53, Plenum Press, New York, 1974.

21) Ojeda, S. R., Andrews, W. W., Advis, J. P. & Smith-White, S.: Recent advances in the endocrinology of puberty. *Endocr. Rev.*, **1**, 228-257 (1980).

22) Kennedy, G. C. & Mitra, J.: Body weight and food intake as initiating factors for puberty in the rat. *J. Physiol.*, **166**, 408-418 (1963).

23) Ronnekleiv, O. K., Ojeda, S. R. & McCann, S. M.: Undernutrition, puberty, and the development of estrogen positive feedback in the female rat. *Biol. Reprod.*, **19**, 414-424 (1978).

24) Kennedy, G. C.: The development with age of hypothalamic restraint upon the appetite of the rat. *J. Endocrinol.*, **16**, 9-17 (1957).

25) Frisch, R. E. & Revelle, R.: Height and weight at menarche and a hypothesis of critical body weights and adolescent events. *Science*, **169**, 397-399 (1970).

26) Frisch, R. E.: Pubertal adipose tissue: is it necessary for normal sexual maturation? Evidence from the rat and human female. *Federation Proc.*, **39**, 2395-2400 (1980).

27) Siegel, L. I. & Wade, G. N.: Insulin withdrawal impairs sexual receptivity and retention of brain cell nuclear estrogen receptors in diabetic rats. *Neuroendocrinology*, **29**, 200-206 (1979).

28) Adashi, E. Y., Hsueh, A. J. W. & Yen, S. S. C.: Insulin enhancement of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release by cultured pituitary cells. *Endocrinology*, **108**, 1441-1449 (1981).

29) 山城 玄: 若年女性における体重減少性無月経症患者的内分泌学的検討. 十全医会誌, **100**, 325-340 (1991).

30) Meijis-Roelofs, H. M. A., Uilenbroek, J. Th. J., de Greef, W. J., de Jong, F. H. & Kramer, P.: Gonadotrophin and steroid levels around the time of first ovulation in the rat. *J. Endocrinol.*, **67**, 275-282 (1975).

31) Ojeda, S. R., Wheaton, J. E., Jameson, H. E. & McCann, S. M.: The onset of puberty in the female rat: Changes in plasma prolactin, gonadotropins, luteinizing hormone-releasing hormones (LHRH), and hypothalamic LHRH content. *Endocrinology*, **98**, 630-638 (1976).

32) Uchida, K., Shozu, M., Tomimatu, N., Terada, S., Akasofu, K. & Nishida, E.: Effect of dehydroepiandrosterone on ovarian function in rats. In K. Ichinoe, S. J. Segal & L. Mastroianni (eds.), *Preservation of Tubo-Ovarian Function in Gynecologic Benign and Malignant Diseases*, Sero Symposium Publications from Raven Press, Vol. 48, p316-325, Raven Press, New York, 1988.

33) Knudsen, J. F. & Mahesh, V. B.: Initiation of precocious sexual maturation in the immature rat treated with dehydroepiandrosterone. *Endocrinology*, **97**, 458-468 (1975).

34) Parker, C. R. & Mahesh, V. B.: Dehydroepiandrosterone (DHA) induced precocious ovulation: Correlative changes in blood steroids, gonadotropins and cytosol estradiol receptors of anterior pituitary gland and hypothalamus. *J. Steroid Biochem.*, **8**, 173-177 (1977).

35) Lu, K. H., Hopper, B. R., Vargo, T. M. & Yen S. S. C.: Chronological changes in sex steroid, gonadotropin and prolactin secretion in aging female rats displaying different reproductive states. *Biol. Reprod.*, **21**, 193-203 (1979).

36) Nequin, L. G., Alvarez, J. & Schwartz, N. B.: Measurement of serum steroid and gonadotropin levels and uterine and ovarian variables throughout 4 day and 5 day estrous cycles in the rat. *Biol. Reprod.*, **20**, 659-670 (1979).

37) Goldzieher, J. W. & Green, J. A.: The polycystic ovary. I. Clinical and histologic features. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **22**, 325-338 (1962).

38) Hughesdon, P. E.: Morphology and morphogenesis of the Stein-Leventhal ovary and of so-called "hyperthecosis". *Obstetrical and Gynecological Survey*, **37**, 59-77 (1982).

39) Zumoff, B., Freeman, R., Coupey, S., Saenger, P., Markowitz, M. & Kream, J.: A chronobiologic abnormality in luteinizing hormone secretion in teenage girls with the polycystic-ovary syndrome. *N. Engl. J. Med.*, **309**, 1206-1209 (1983).

40) Yen, S. C. C.: The polycystic ovary syndrome. *Clin. Endocrinol.*, **12**, 177-208 (1980).

41) Goldzieher, J. W.: Polycystic ovarian disease. *Fertil. Steril.*, **35**, 371-394 (1981).

42) McKenna, T. J.: Pathogenesis and treatment of polycystic ovary syndrome. *N. Engl. J. Med.*, **318**, 558-562 (1988).

43) Franks, S.: Polycystic ovary syndrome: A changing perspective. *Clin. Endocrinol.*, **31**, 87-120 (1989).

44) Lobo, R. A. & Goebelsmann, U.: Effect of androgen excess on inappropriate gonadotropin secretion as found in the polycystic ovary syndrome. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **142**, 394-401 (1982).

- 45) Rosenfield, R. L., Barnes, R. B., Cara, J. F. & Lucky, A. W.: Dysregulation of cytochrome P450c17 α as the cause of polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.*, **53**, 785-791 (1990).
- 46) Judd, H. L., McPherson, R. A., Rakoff, J. S. & Yen, S. S. C.: Correlation of the effects of dexamethasone administration on urinary 17-ketosteroid and serum androgen levels in patients with hirsutism. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **128**, 408-417 (1977).
- 47) Lachelin, G. C. L., Barnett, M., Hopper, B. R., Brink, G. & Yen, S. C. C.: Adrenal function in normal women and women with the polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **49**, 892-898 (1979).
- 48) Chang, R. J., Mandel, F. P., Wolfsen, A. R. & Judd, H. L.: Circulating levels of plasma adrenocorticotropin in polycystic ovary disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **54**, 1265-1267 (1982).
- 49) Evron, S., Navot, D., Laufer, N. & Diamant, Y. Z.: Induction of ovulation with combined human gonadotropins and dexamethasone in women with polycystic ovarian disease. *Fertil. Steril.*, **40**, 183-186 (1983).
- 50) Meikle, A. W., Worley, R. J. & West, C. D.: Adrenal corticoid hyperresponsiveness in hirsute women. *Fertil. Steril.*, **41**, 575-579 (1984).

Studies on Effects of Dehydroepiandrosterone on Vaginal Opening and Sexual Cyclicity in Female Rat
Kiyoshi Uchide, Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med Soc., **102**, 349—357 (1993)

Key words female rat, dehydroepiandrosterone, vaginal opening, sexual cycle

Abstract

To investigate the effect of dehydroepiandrosterone (DHA) on the sexual function in the female rat, the time of vaginal opening and the sexual cycle were observed by vaginal smears. DHA-acetate (DHA-Ac) (1, 2 or 10 mg per 100 g body weight, BW) was injected subcutaneously to the back of female Wistar rats at the 5th, 10th, 15th, 20th, 25th, or 30th day after birth. Under the administration of 10 mg/100 g BW of DHA-Ac, the time from birth to vaginal opening was 59.4~81.2% compared to the control group, and those injected on the 10th and 20th day after birth showed a particularly short time to vaginal opening of 60.7% and 59.4% of the controls. In groups injected on the 5th, 10th, 15th, and 20th day, the duration between vaginal opening and first estrus increased markedly to 6.3~14.4 days compared to 0.2~1.1 days in the control group, but the groups injected on the 25th and 30th day increased to only 2.1 and 1.7 days respectively. Among the groups administered 10 mg/100 g BW of DHA-Ac, the proportion of irregular cycles, judged by daily vaginal smear, increased by 1.5~2.6 times. In rats which were administered 2 mg/100 g BW of DHA-Ac, only those which were injected on the 20th, 25th, and 30th day after birth showed significant effects: the time from birth to vaginal opening was 79.5~82.4% of the control, and the duration between vaginal opening and first estrus increased to 2.4~5.8 days compared to 0.3~1.1 days in the control group, and the proportion of irregular cycles increased by 1.6~2.2 times. Under the administration of 1 mg/100 g BW of DHA-Ac, no marked effect was observed except for earlier vaginal opening in rats injected at the 30th day. These results suggest that large increases of DHA during the neonatal or infantile periods, even if transient, suppress sexual function, and that moderate increases of DHA during the prepubertal period hasten sexual maturity in female rats.